

Разработка микрочиповой аналитической системы с лиофилизированными ПЦР реагентами в алюминиевых микрочипах, модифицированных методом плазменно-химического осаждения

***А.О. Суворова^{1,2}, П.Н. Машьянов², Ю.В. Ашина²,
М.Н. Сляднев^{1,2}, А.А. Ганеев¹**

¹Санкт-Петербургский Государственный университет,
Российская Федерация, 198504, Санкт-Петербург, Университетский проспект, 26

²ГК «Люмэкс», Российская Федерация, 192029, Санкт-Петербург,
пр. Обуховской обороны, д.70, корп.2, Лит. «Е»

*Адрес для переписки: Суворова Александра Олеговна, E-mail: Alexandra.suvorova@lumex.ru

Поступила в редакцию 23 октября 2015 г., после исправления – 23 ноября 2015 г.

Микрочиповые аналитические системы для молекулярно-генетического анализа в последние годы привлекают повышенный интерес исследователей. Алюминиевые микрочипы являются особенно перспективными для внедрения микрочипового формата полимеразной цепной реакции (ПЦР) в лабораторную практику. Подобные микрочипы требуют пассивации поверхности для предотвращения ингибирования ПЦР и улучшения аналитических характеристик системы. Привлекательна и возможность снижения трудозатрат и ошибок оператора за счет лиофилизации реактивов в микрочипах. Микрочипы с лиофилизированными реагентами позволяют избежать сложностей, связанных с хранением при низкой температуре, сокращают количество стадий пипетирования и тем самым уменьшают риск ложноположительных результатов, которые могут быть вызваны контаминацией проб. В работе предложен метод иммобилизации реагентов для ПЦР в микрореакторах алюминиевых микрочипов, поверхность которых была предварительно пассивирована с помощью плазменно-химического осаждения из газовой фазы (ПХО). В качестве модельных объектов для лиофилизации выбраны тест-системы для определения фрагмента гена 35S вируса мозаики цветной капусты, используемого в генетически-модифицированных организмах (ГМО), фрагмента геномной ДНК микроорганизма *Mycoplasma hominis*, а также фрагмента гена глобина человека (белковая часть гемоглобина человека). Разработана экспериментальная установка для лиофилизации, которая позволила оптимизировать условия проведения процесса. Показано, что полученные таким образом алюминиевые микрочипы могут храниться не менее двух месяцев при комнатной температуре, и их аналитические характеристики сравнимы с ПЦР с использованием жидких реактивов, при в 20 раз меньшем потреблении реактивов и в 2-3 раза меньшем количестве операции пипетирования.

Ключевые слова: Полимеразная цепная реакция, алюминиевые микрочипы, плазменно-химическое осаждение, лиофилизация.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2015, vol. 19, no. 4, pp. 331-339

DOI: 10.15826/analitika.2015.19.4.010

Development of a microchip analytical system with PCR reagents lyophilized into aluminum microchips and modified by the plasma enhanced chemical vapor deposition

***A.O. Suvorova^{1,2}, P. N. Mashyanov², Y.V. Ashyna²,
M.N. Slyadnev^{1,2}, A.A. Ganeev¹**

¹Saint-Petersburg State University,
Unuversitetskii pr. 26, Saint-Petersburg, 198504, Russian Federation

²Lumex Ltd., Obukhovskoi oborony pr., 70, b.2, «Е», Saint-Petersburg,
192029, Russian Federation

*Corresponding author: Alexandra O. Suvorova, E-mail: Alexandra.suvorova@lumex.ru

Microchip analytical systems for the polymerase chain reaction (PCR) have attracted an increased interest of researchers in recent years. Aluminum microchips are particularly promising for the microchip PCR techniques implementation in a routine laboratory practice. However, the surface of the chips needs to be chemically inert for the PCR inhibition prevention and improved analytical characteristics of the system. It should also be noted that the possibility of decreasing of handling procedures and operator mistakes by using lyophilized reagents inside microreactor remains very attractive. Such microchip systems allow avoiding some of the storage difficulties and significantly decrease the number of pipetting stages. All of these lead to minimizing the risk of false positive results due to the sample cross-contamination. In this paper a method of PCR reagents lyophilization into the microreactors of aluminum microchips was developed. The surface of the microchip was modified using the Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition (PE CVD). As the model reagents for the lyophilization, the PCR test systems for 35S gene fragment determination (cauliflower mosaic virus) and human globin (protein part of human GEM) were used. The newly developed experimental system for lyophilization allowed optimizing the process for several microchips. It was shown that the obtained aluminum microchip could be stored under the ambient conditions up to 5 months and their analytical characteristics are comparable with the test-tube PCR, with 20 times less the reagents consumption and 2-3 times less the number of pipetting steps.

Keywords: polymerase chain reaction, aluminum microchips, plasma enhanced chemical vapor deposition, lyophilization.

ВВЕДЕНИЕ

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР РВ) широко используется в лабораторной практике и позволяет решать разнообразные аналитические задачи в области медицины [1], криминалистики [2] и пищевой промышленности [3]. Развитие экспрессных методов проведения ПЦР в первую очередь диктуется необходимостью быстрой и точной идентификации вирусных или бактериальных нуклеиновых кислот в клинической диагностике.

С целью повышения быстродействия и производительности для рутинных исследований широкое распространение в современных ПЦР анализаторах получили микрочиповые подходы [4, 5]. К основным преимуществам микрочипов по сравнению со стандартными пробирками можно отнести значительное сокращение объема проб и дорогостоящих реактивов, требуемых для проведения одной реакции [6, 7], а также улучшение основных аналитических характеристик метода за счет высоких скоростей термоциклирования [8].

Известно, что ПЦР реагенты требуют особых условий хранения, нарушение которых приводит к постепенной деградации и снижению биологической активности основных компонентов ПЦР смеси, в частности – фермента полимеразы [9]. Необходимость использовать специальное холодильное оборудование затрудняет проведение ПЦР вне лабораторий. Важной задачей в этом направлении является стабилизация компонентов ПЦР таким образом, чтобы можно было хранить готовую смесь реактивов при комнатной температуре.

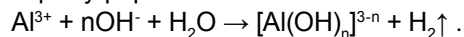
Технология лиофилизации ПЦР реагентов непосредственно в пробирках или микрочипах позволяет избежать сложностей, связанных с их хранением. Ранее, помимо высушивания отдельных компонентов, была также показана возможность совместного хранения всех ПЦР реактивов, за ис-

ключением буферного раствора [10]. Такой подход позволил значительно сократить количество стадий пипетирования и тем самым уменьшить риск ложноположительных результатов, возникающих при кросс-контаминации проб [11].

Таким образом, иммобилизация ПЦР смеси в ячейках микрочипа позволяет объединить преимущества лиофильных реагентов и миниатюрных реакторов.

В предыдущих работах нами были изучены особенности и оптимальные параметры лиофилизации всех компонентов ПЦР смеси (за исключением буфера) в микрореакторах 30-ячеестого кремниевого чипа [12]. Было показано, что готовые микрочипы могут храниться при комнатной температуре в течение 6 месяцев.

Действенным методом для повышения производительных характеристик и сокращения затрат на один анализ в рамках микрочипового подхода стала замена материала подложки с кремния на более доступный и технологичный алюминий. Однако при pH = 8.3 и повышенных температурах в условиях ПЦР алюминий активно вступает в реакцию с ПЦР-буфером



Образующиеся газообразные продукты затрудняют детектирование флуоресценции в ячейках (рис. 1). Поэтому, для того, чтобы лиофилизировать ПЦР-реагенты на поверхности алюминия, сначала необходимо было разработать технологичный способ пассивации поверхности, который сможет обеспечить равномерность, а также стабильность защищающего покрытия.

Ранее в работе [13] была предложена методика модификации поверхности алюминиевых микрочипов с использованием тетрахлорида кремния (газовая фаза) для образования слоя оксида кремния, предотвращающего ингибирование ПЦР алюминием. Применение такой методики при масштабном производстве существенно осложнялось невысо-

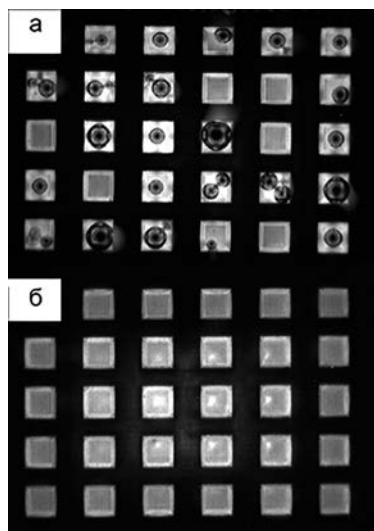


Рис. 1. Влияние поверхности алюминиевого микрочипа на флуоресцентное детектирование продуктов ПЦР РВ при нагреве до 95 °С: а – необработанная пластина, б – обработанная пластина

кой воспроизводимостью свойств полученных пленок, а также необходимостью работы с агрессивными веществами (SiCl_4) и их утилизацией.

Потенциально более удобной и масштабируемой технологией обработки алюминия является пассивация с помощью плазмохимического осаждения из газовой фазы (ПХО) [14–16]. ПХО обладает рядом преимуществ относительно других методов модификации поверхности. Полученные таким образом пленки имеют высокую сплошность, что обуславливает их прочность и стабильность. Скорости осаждения покрытий (в диапазоне 1–10 нм/с) значительно превосходят другие традиционные вакуумные методы. Также можно получить покрытие однородной толщины на субстратах с профилированной поверхностью, что является очень важным параметром для микрочипов, в которых созданы микрореакторы с различной формой.

Таким образом, целью данной работы явилась разработка метода лиофилизации ПЦР реагентов на поверхности алюминиевых микрочипов, обработанных в газоразрядной плазме. В качестве модельных объектов для лиофилизации были выбраны праймеры и зонды ПЦР тест-систем для определения фрагмента гена 35S вируса мозаики цветной капусты, фрагмента гена глобина человека, а также фрагмента геномной ДНК микроорганизма *Mycoplasma hominis*. Лيوфилизацию производили в экспериментальной установке, моделирующей условия производственных аналогов. Полученные результаты сравнивали с аналогичными для алюминиевых микрочипов, модифицированных в жидкой среде, и для кремниевых микрочипов. Все ПЦР исследования проводили с использованием микрочипового амплификатора «АриаДНА» (Люзкс, Россия) в режиме реального времени с двуканальным детектированием флуоресценции [13].

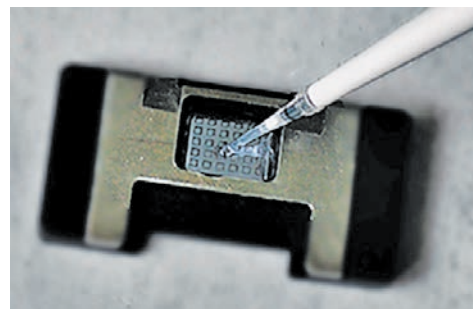


Рис. 2. 30-ячеистый микрочип в картридже прибора, заполненный герметизирующей жидкостью для предотвращения испарения проб

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Устройство алюминиевого микрочипа

Ранее нами было показано, что использование для изготовления микрочипов алюминия, обладающего хорошими теплопроводящими свойствами позволяет достичь высоких скоростей нагрева и охлаждения реакционной смеси в микрореакторах [13]. На рис. 2 показан пример готового микрочипа, помещенного в картридж прибора. Алюминиевый микрочип вмещал в себя 30 микрореакторов (объем каждого составил 1.2 мкл), изготовленных методом штамповки. Во избежание кросс-контаминации проб и для обеспечения растекания растворов в микрореакторе, поверхностям внутри и вне ячеек придавались гидрофильные и гидрофобные свойства, соответственно.

Пассивация алюминиевых микрочипов с последующей гидрофилизацией поверхности

1. Методика обработки алюминиевых микрочипов без применения метода ПХО

Исходные алюминиевые пластины протравливали в 0.1 М растворе гидроксида натрия (Нева-реактив) в течение 10 минут с целью очистки поверхности. Далее их отмывали дистиллированной водой от остатков щелочи и помещали в гидрофилизирующий раствор (0.1 М поливинилпирролидон (Aldrich Chemistry) и 0.01 М Tween-20 (Helicon), в смеси фосфатно-солевого буфера (0.01 М, pH = 7.3–7.5, Биолот, Россия) с изопропиловым спиртом (Нева-реактив) в ультразвуковую баню в течение 10 минут. При этом активные компоненты раствора физически сорбировались на поверхности алюминиевых пластин, образуя плёнку.

2. Методика обработки алюминиевых микрочипов с применением метода ПХО

Для придания гидрофильных и защитных свойств поверхности алюминия с помощью метода ПХО использовали плазменную установку Diener Pico (Diener Electronic). Обезжиренные в ацетоне («х.ч.», Нева-реактив) микрочиповые пластины помещали в камеру и подвергали обработке сначала

ла в плазме аргона ($W = 200$ Вт, 5 минут), затем – в плазме кислорода ($W = 200$ Вт, 35 минут). После ПХО следовала либо стадия гидрофилизации с помощью физической сорбции, как описано выше в п. 1, либо следующая стадия гидрофобизации поверхности вне микрореакторов.

3. Гидрофобизация поверхности алюминиевых микрочипов вне микрореакторов

В обоих случаях модификации по п. 1 и п. 2. внешнюю поверхность микрочипов подвергали гидрофобизации с помощью силиконового штампа, смоченного раствором полидиметилсилоксана «Пента 107» (ООО «Пента Север») в бутилацетате (х.ч., Экос-1). После гидрофобизации обработанные микрореакторные пластины приклеивали к пластиковым рамкам.

Состав подготовленной смеси для лиофилизации ПЦР-реактивов

В качестве модельных ПЦР тест-систем для лиофилизации были выбраны праймеры и зонды для определения фрагмента гена 35S вируса мозаики цветной капусты, используемого в ряде генетически-модифицированных растений, фрагмента геномной ДНК возбудителя инфекционных заболеваний человека *Mycoplasma hominis*, а также для определения фрагмента гена глобина человека (данная тест-система используется в качестве контроля выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов пациентов).

Для лиофилизации одного микрочипа готовили 30 мкл смеси (из расчета по 1 мкл на каждый микрореактор), в котором содержались все компоненты ПЦР смеси за исключением ПЦР-буфера, а именно: 2.5 мкл 2.5 мМ р-ра дНТФ (Helicon), 2.4 мкл 2.5 нМ смеси прямого и обратного праймера, а также флуоресцентного зонда (ДНК-синтез), соответствующих выбранной тест-системе, 0.3 мкл Taq-полимеразы (5 ед./мкл, Evrogen). В качестве стабилизирующих добавок использовали: D-(+)-трегалозы дигидрат (Bio Chemika Fluka) для частичной инактивации полимеразы, поливинилпирролидон (Aldrich Chemistry) для предупреждения денатурирования и Tween 20 (Aldrich Chemistry) для стабилизации всей смеси в целом.

Экспериментальная установка для иммобилизации ПЦР реактивов

Собранные микрочипы помещали на охлажденную до -18°C поверхность металлического блока. Готовую лиофильную смесь вносили по каплям с помощью одноканального электронного дозатора в режиме многократного дозирования по 1 мкл в каждый микрореактор.

В качестве рабочей камеры модельной установки для лиофилизации был выбран вакуумный

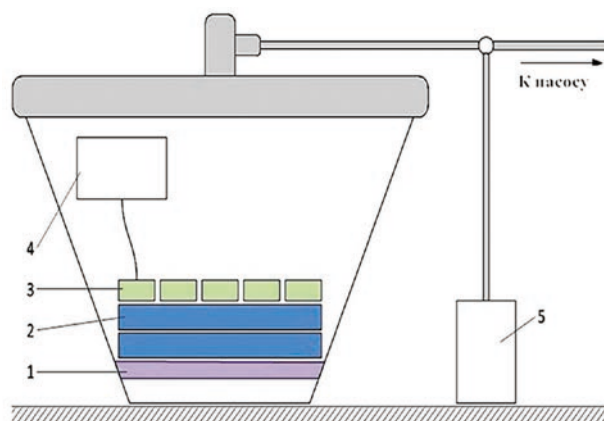


Рис. 3. Схема установки для лиофилизации ПЦР-реактивов в микрочипах. На керамической подставке (1) находится хладагент (2), на поверхность которого помещены микрочипы (3) и термочип (4), давление контролируется с помощью вакуумметра (5)

эксикатор объемом 4 л, позволяющий разместить блок хладагентов и 16 микрочипов (см. рис. 3). Стенки эксикатора и керамическая подставка обеспечивали достаточную теплоизоляцию системы, сохраняя низкую температуру блока хладагентов. Пониженное давление создавалось при помощи подсоединенного к эксикатору форвакуумного насоса (SD90, Varian), позволяющего работать без использования конденсора с небольшими объемами раствора. С помощью тройника между эксикатором и насосом к системе был подключен вакуумметр Мерадат-ВИТ16Т1.

Для контроля температуры раствора использовали полупроводниковый термодатчик, присоединенный к алюминиевому микрочипу с помощью герметика. Такое устройство позволяло не только измерять температуру внутри экспериментальной установки, но и оценивать температуру на поверхности микрочипа.

Условия лиофилизации ПЦР реагентов в модельной установке

При использовании лиофилизации, как метода иммобилизации ПЦР-реактивов, требуется соблюдение определенных условий. Так, при лиофилизации высушиваемый препарат необходимо предварительно заморозить, а затем сублимировать растворитель внутри вакуумной камеры. При этом важно сохранять препарат в замороженном состоянии, чтобы избежать кипения раствора. Температура препарата не должна превысить 0°C (в случае использования в качестве растворителя воды) до того момента, пока давление в системе не опустится до уровня тройной точки воды, т.е. до 611 Па [17].

Для собранной экспериментальной установки, показанной на рис. 3, мы наблюдали следующие зависимости температуры и давления от времени (рис. 4). Из полученных зависимостей видно, что давление достигает значения 611 Па в среднем

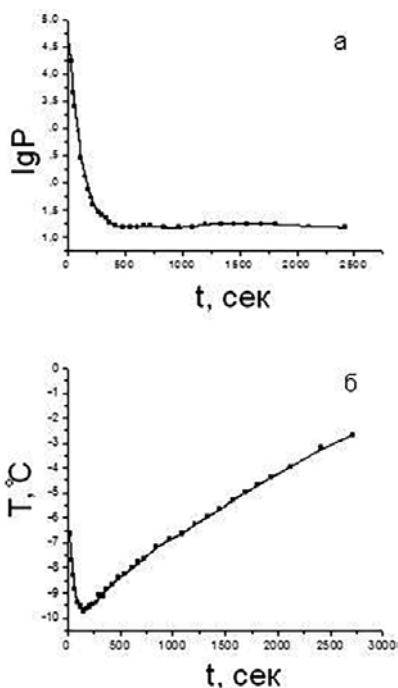


Рис. 4. Графики зависимости десятичного логарифма давления (а) и температуры (б) от времени внутри рабочей камеры для лиофилизации ПЦР-реагентов

за 5 минут, в то время как температура остается отрицательной на протяжении 45 минут. Характер зависимости температуры от времени обусловлен тем, что первоначально на показания термодатчика влияет воздух комнатной температуры, находящийся в рабочей камере. При понижении давления показания термодатчика определяются уже только хладагентом, и температура доходит до минимального значения. Последующий постепенный рост температуры обусловлен частичным теплообменом системы с окружающей средой.

Температура плавления раствора, содержащего все компоненты, была оценена в предварительных экспериментах, и составила -2°C . Таким образом, было установлено, что хладагент позволяет сохранить температуру ниже температуры плавления до момента достижения давления 611 Па, после чего возможна только сублимация растворителя, но не его таяние.

Проведение ПЦР на лиофилизированных микрочипах

При использовании микрочипов с иммобилизованными реагентами для проведения ПЦР необходимо было смешать исследуемую пробу с 10-ти кратным ПЦР-буфером в соотношении 9 : 1. Перед раскапыванием в чип вводили 620 мкл минерального масла (ПМС-400) так, чтобы масло полностью закрывало поверхность микрочипа. С помощью микродозатора в каждую ячейку микрочипа вводили по 1.2 мкл смеси проба-буфер. Анализ ДНК проводили, используя термопротокол, состоящий из одной стадии прогрева 120 с при 94°C и 45 циклов: 1 с при 94°C и 30 с при 60°C . Кривые ПЦР РВ были

получены на каналах регистрации, соответствующих красителям FAM и ROX (максимумы длин волн возбуждения 485 нм и 560 нм, соответственно). Полученные результаты обрабатывались с помощью программного обеспечения (ПО) амплификатора «АриаДНА» (Люмэкс). С помощью этого ПО пороговый цикл (C_t) определяли согласно методу максимума второй производной.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оптимизация методики модификации поверхности микрочипа

Как уже отмечалось выше, перед лиофилизацией и проведением ПЦР микрочип необходимо очистить от органических загрязнений, которые могут ингибировать ПЦР, а также придать гидрофильные и гидрофобные свойства разным частям поверхности пластины. При обработке поверхности кремниевых микрочипов покрытых инертным слоем оксида кремния жидкими химическими агентами (щелочи, кислоты) с последующей лиофилизацией реактивов были получены удовлетворительные результаты ПЦР [18].

Однако при переходе от кремниевых к более технологичным алюминиевым пластинам обработка поверхности в растворах кислот и щелочей не привела к устойчивому положительному результату. Обработка алюминиевых микрореакторных пластин в щелочи с последующим покрытием физически сорбированными пленками была значительно технологичнее тетрааклорсиланового подхода [12] и давала стабильную гидрофильность поверхности, но, по причинам слабых связей, удерживающих активные компоненты в виде пленки, такой способ модификации не обеспечивал надлежащую инертность поверхности алюминия в условиях ПЦР. На микрочипах, обработанных в растворе щелочи, были получены удовлетворительные ПЦР результаты при использовании жидких реактивов, однако было установлено, что при попытке лиофилизации такие микрочипы демонстрировали сниженную интенсивность флуоресцентного сигнала, невысокую эффективность реакции и не сохраняли свои свойства во времени.

С другой стороны, подход плазмохимической модификации является менее деструктивным для морфологии поверхности микрочипа. Бомбардирование ионами аргона выравнивает микроскопические механические неоднородности на поверхности и удаляет большинство органических загрязнителей. Плазма кислорода взаимодействует с поверхностью алюминия с образованием тонкого и равномерного слоя оксида алюминия, который является инертным и потенциально подходит для пассивации поверхности в условиях проведения ПЦР. К тому же, после обработки в плазме аргона и кислорода поверхность микрочипов становится гидрофильной. Но достаточно ли гидрофильна полученная поверхность, чтобы обеспечить сма-

Таблица 1

Пороговые циклы для ПЦР РВ, проведенной в алюминиевых микрочипах с иммобилизованными и жидкими реагентами

Тест-система (краситель)	Пороговые циклы C_t			
	Иммобилизованные реагенты			Жидкие реагенты
	замораживание при -30 °С	замораживание при -18 °С	без замораживания	-
Глобин (ROX)	26.3 ± 0.2	26.4 ± 0.3	25.9 ± 0.4	26.8 ± 0.5
Глобин (FAM)	26.3 ± 0.2	26.7 ± 0.5	26.4 ± 0.2	26.5 ± 0.4
<i>Mycoplasma hominis</i> (FAM)	26.1 ± 0.4	26.6 ± 0.9	26.7 ± 0.3	27.3 ± 0.9

чивание микрореакторов для дальнейших манипуляций с микрочипом?

Для сравнения двух подходов в гидрофилизации поверхности были подготовлены две серии микрочипов с иммобилизованной тест-системой для выявления глобина в геноме человека. Один из микрочипов подвергли гидрофилизации с помощью растворов реагентов, создающих физически сорбированную пленку на поверхности (как указано в п. 1 Экспериментальной части). На поверхности другого микрочипа иммобилизовали ПЦР-реагенты непосредственно после плазмохимической обработки (по п. 2 Экспериментальной части).

Результаты ПЦР показали, что исключение стадии гидрофилизации с помощью физически сорбированной пленки не привело к негативным влияниям на проведение ПЦР. Пороговые циклы совпали с точностью до доверительных интервалов ($C_t = 26.9 \pm 0.6$ ($n = 30$, $P = 0.95$) – микрочип после ПХО, без дополнительной обработки, $C_t = 27.6 \pm 0.4$ ($n = 28$, $P = 0.95$) – микрочип после ПХО со стадией гидрофилизации. Таким образом, оптимальным был принят метод обработки поверхности микрочипов, в котором отсутствовала стадия дополнительной гидрофилизации с помощью физически сорбированной пленки, что позволило сократить технологические операции по подготовке микрочипов.

Сравнение методов иммобилизации реагентов

Известно, что способ иммобилизации реагентов может влиять не только на плотность полученного слоя, но и на физико-химические свойства самих стабилизируемых белков. Для того, чтобы оценить подобное влияние на ПЦР-реагенты и на их дальнейшую реакционную способность, было проведено сравнение двух способов иммобилизации реагентов, а именно: лиофилизации путём сублимации растворителя при пониженном давлении и испарение растворителя (также при пониженном давлении). Для сравнительных экспериментов были выбраны тест-системы *Mycoplasma hominis* (с красителем ROX), и глобин (с красителями ROX и FAM). Микрочипы с внесенными реагентами подготовили для лиофилизации разными методами: одну серию микрочипов заморозили при температуре

-18 °С, вторую – при температуре -30 °С, а третью – не замораживали. Первые две серии микрочипов были помещены на поверхность хладагента для того, чтобы поддержать начальные температуры, а третий тип поместили в установку без хладагента.

Далее на микрочипах были проведены ПЦР, в качестве контроля была проведена ПЦР с использованием жидких реагентов. Результаты ПЦР приведены в табл. 1, из которой следует, что использование иммобилизованных реагентов не привело к увеличению пороговых циклов ПЦР, по сравнению с жидкими реагентами.

Усредненные ПЦР кривые (по 30 отдельным анализам для каждого случая) модельных тест-систем в нормальном и дифференциальном видах приведены на рис. 5. Как видно из графиков, реагенты, которые были предварительно заморожены, продемонстрировали высокую интенсивность флуоресцентного сигнала, из чего можно сделать вывод, что в процессе лиофилизации все биологически-активные компоненты ПЦР подверглись лишь незначительной деградации. Вероятно, что при заморозке реагентов с последующей сублимацией полученный лиофильный остаток обладает более плотной и устойчивой структурой, что позволяет реагентам работать эффективнее, чем в случае испарения растворителя из матрицы стабилизатора. Отметим, что оба типа флуоресцентных зондов с красителями FAM и ROX показали одинаковые тенденции, что свидетельствует об отсутствии фотодеструктивных процессов во время лиофилизации реагентов.

Кроме значения порогового цикла важным параметром является также величина эффектив-

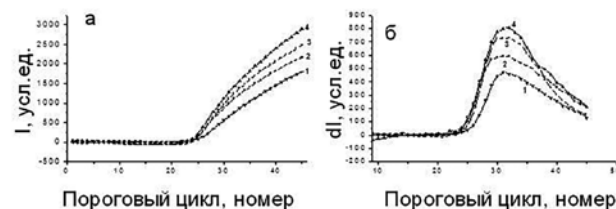


Рис. 5. Усредненные кривые ПЦР РВ для тест-системы *Mycoplasma hominis* (FAM) – А, усредненные кривые ПЦР РВ в дифференциальном виде для тест-системы глобин (FAM) – Б: 1 – жидкие реагенты; 2 – иммобилизованные реагенты без предварительного замораживания; 3 – лиофилизированные реагенты с предварительным замораживанием до -18 °С; 4 – лиофилизированные реагенты с предварительным замораживанием до -30 °С

Таблица 2

Значения углового коэффициента a для линейного участка кривых ПЦР РВ для лиофилизированных и жидких реактивов на примере тест-системы Глобин с красителями FAM и ROX

Тест-система (краситель)	Угловой коэффициент a			
	Иммобилизованные реактивы			Жидкие реактивы
	замораживание при -30°C	замораживание при -18°C	без замораживания	-
Глобин (ROX)	773	738	698	424
Глобин (FAM)	780	713	573	450

ности ПЦР, которую можно оценить по углу наклона линейного участка кривой ПЦР РВ: чем больше значение угла наклона a , тем более эффективно проходит амплификация. С целью сравнить эффективность ПЦР, проводимых с использованием реактивов, иммобилизованных различными способами, были рассчитаны значения угловых коэффициентов a , которые приведены в табл. 2. Как видно из таблицы, наиболее высокую эффективность показали реактивы, предварительно замороженные в микрочипе до -30°C . Вероятно, это связано с тем, что при глубокой заморозке матрица трегалозного стабилизатора и воды формирует гомогенную структуру. При дальнейшей сублимации растворителя из образовавшегося лиофильного остатка молекулы ПЦР компонентов равномерно окружены молекулами стабилизаторов и не подвергаются деградации.

Отметим, что способ иммобилизации реактивов путем испарения растворителя без заморозки показывает несколько меньшую эффективность ПЦР по сравнению со способом лиофилизации с заморозкой (-18°C и -20°C). Вероятно, это связано с тем, что испарение растворителя из жидкой фазы может сопровождаться приповерхностным концентрированием некоторых компонентов ПЦР смеси и как следствие неполной стабилизацией фермента.

Оптимизация времени лиофилизации реактивов

Для того, чтобы оптимизировать время лиофилизации, были произведены контрольные взвешивания микрочипов с лиофильным остатком во

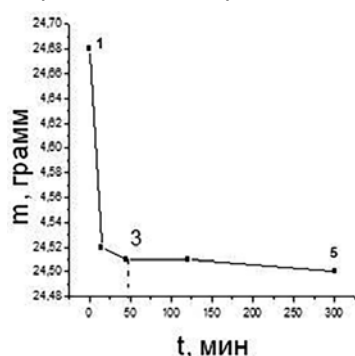


Рис. 6. График зависимости массы шести микрочипов от времени лиофилизации: 1 — масса микрочипов с жидкой лиофильной смесью; 5 — масса пустых микрочипов 3 — оптимальное время лиофилизации (45 минут)

время лиофилизации. Из рис. 6 следует, что основная масса растворителя сублимирует через 15 минут, а после 45 минут наблюдается незначительное падение массы. Лيوфилизация в течение 120 минут не приводит к дополнительной сублимации. Таким образом, нами был сделан вывод, что 45 минут достаточно для полной лиофилизации ПЦР реагентов в микрореакторах микрочипа. Полученное оптимальное время лиофилизации существенно меньше (в 25-30 раз) времени, необходимого для высушивания реагентов при атмосферном давлении (20-24 часа) [12], что позволяет сократить временные затраты при массовом производстве микрочипов и увеличить производительность установки. Кроме того, меньшее время лиофилизации по сравнению с высушиванием снижает вероятность деградации фермента Taq-полимеразы за время удаления растворителя из иммобилизуемой смеси ПЦР реактивов.

Проверка длительности хранения микрочипов с лиофилизированными реактивами

Для того, чтобы оценить срок хранения алюминиевых микрочипов с лиофилизированными реактивами была изготовлена тестовая партия микрочипов для определения глобина человека (с красителем FAM). Микрочипы с лиофилизированными реактивами, дополнительно закрытые полимерной пленкой с клеевым слоем, хранили при комнатной температуре более двух месяцев. Получено, что значения порогового цикла ПЦР при хранении меняются несущественно. При дальнейшем хранении наблюдалось небольшое снижение эффективности (рис. 7) реакции, хотя она оставалась достаточно высокой для проведения качественного анализа на алюминиевых микрочипах.

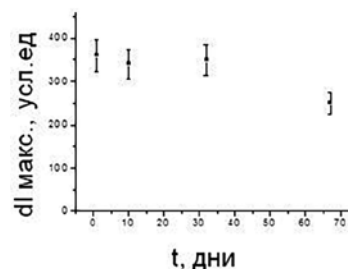


Рис. 7. Зависимость значения максимума производной аналитического сигнала от срока хранения ПЦР реактивов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, был разработан метод лиофилизации ПЦР-реагентов на поверхности алюминиевых микрочипов с помощью модельной установки в течение всего 45 минут. Модификация поверхности алюминия с помощью плазмохимического осаждения показала хорошую совместимость полученного покрытия с процессом лиофилизации и достижение приемлемой длительности хранения микрочипов с лиофилизированными реагентами. В дальнейшем планируется использовать такой подход для лиофилизации реагентов для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ), что открывает новые возможности для использования лиофилизированных тест-систем.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы работы благодарят Ресурсный Центр СПбГУ «Нанотехнологии» за проведение ряда измерений с использованием аналитической аппаратуры Центра.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the St. Petersburg State University Resource Center "Nanotechnologies" for a series of measurements using the analytical equipment of the Center.

ЛИТЕРАТУРА

1. Murphy J., Bustin S.A. Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: Gold standard or substandard? // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2009. V. 9, I. 2. P. 187-197.
2. Sperling F.A.H., Anderson G.S., Hickey D.A. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation // *J. of Forensic Sciences*. 1994. V. 39, I. 2. P. 418-427.
3. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens / J.E. Olsen [et al.] // *International J. of Food Microbiology*. 1995. V. 28, I. 1. P. 1-78.
4. Simulation and experimental study of PCR chip based on silicon / Y. Weiping [et al.] // *Sensors and Actuators B*. 2005. V. 108. P. 695-699.
5. Analysis of multiplex PCR fragments with PMMA microchip / D. Liu [et al.] // *Talanta*. 2006. V. 68. P. 616-622.
6. Nanoliter high throughput quantitative PCR / T. Morrison [et al.] // *Nucleic Acids Research*. 2006. V. 34, N. 18. P. 1-9.
7. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping using nanofluidic Dynamic Arrays / J. Wang [et al.] // *BMC Genomics*. 2009. V. 10. P. 1471-1484.
8. Сляднев М.Н. Микрочиповые системы для молекулярно-генетического анализа // *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева)*. 2011. Т. LV, № 2. С. 118-132.
9. Millis K.B., Ferre F., Gibbs R.A. The polymerase Chain Reaction. Boston: Birkhauser, 1994. 458 pp.
10. US 7118910 B2. Microfluidic device and methods of using same / Unger M. [et al.] (USA) № US 10/306,798; заявл. 27.11.2002; опубл. 10.10.2006.

11. RU 2 259 401 C1. Сухая смесь реагентов для ПЦР и способ проведения ПЦР-анализа / Шайхаев Г.О. (РФ) №2259401; заявл. 27.04.2004; опубл. 27.08.2005.
12. Микрочиповая аналитическая система для мультиплексного анализа методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с иммобилизованными в микрореакторах реагентами. / Д.В. Наволоцкий [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2011. Т. 47, № 2. С. 1-8.
13. Мультиплексная аналитическая система для определения ДНК методом ПЦР в реальном времени / Д.В. Наволоцкий [и др.] // *Научное приборостроение*. 2010. Т. 20, № 1. С. 10-20.
14. Deposition of diamond-like carbon films on aluminium substrates by RF-PECVD technique: Influence of process parameters / N. Ravi [et al.] // *Diamond & Related Materials*. 2007. V. 16. P. 90-97.
15. Characteristics of SiO_x thin films deposited by atmospheric pressure chemical vapor deposition as a function of HMDS/O₂ flow rate / E. Gil [et al.] // *Thin Solid Films*. 2010. V. 518. P. 6403-6407.
16. Characterisation of SiO_xCyHz thin films deposited by low-temperature PECVD / S. Zaninia [et al.] // *Vacuum*. 2008. V. 82. P. 290-293.
17. Rey L., May J.C. Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. New York: Taylor and Francis, 2004. 600 pp.
18. Rapid determination of sexually transmitted infections by real-time polymerase chain reaction using microchip analyzer / O. Suvorova [et al.] // *Engineering*. 2012. V. 4. P. 1-3.

REFERENCES

1. Murphy J., Bustin S.A. Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: Gold standard or substandard? *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2009, vol. 9, no. 2, pp. 187-197. doi: 10.1586/14737159.9.2.187
2. Sperling, F.A.H., Anderson, G.S., Hickey, D.A. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *Journal of Forensic Sciences*, 1994, vol. 39, no. 2, pp. 418-427.
3. Olsen J.E., Aabo S., Hill W., Notrmans S., Wernars K., Granum P.E. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, vol. 28, no. 1, pp. 1-78. doi: 10.1016/0168-1605(94)00159-4.
4. Weiping Y., Liqun D., Jing W., Lingzhi M., Jianbo Z. Simulation and experimental study of PCR chip based on silicon. *Sensors and Actuators B*, 2005, vol. 108, pp. 695-699. doi: 10.1016/j.snb.2004.11.049
5. Liu D., Zhou X., Zhong R., Ye N., Chang G., Xiong W. Analysis of multiplex PCR fragments with PMMA microchip. *Talanta*, 2006, vol. 68, pp. 616-622. doi: 10.1016/j.talanta.2005.04.064.
6. Morrison T., Hurley J., Garcia J., Yoder K., Katz A., Roberts D., Cho J., Kanigan T., Ilyin S.E., Horowitz D., Dixon J.M., Brennan C. J.H. Nanoliter high throughput quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 2006, vol. 34, no. 18, pp. 1-9. doi: 10.1093/nar/gkl639.
7. Wang J., Lin M., Crenshaw A., Hutchinson A., Hicks B., Yeager M., Berndt S., Huang W., Hayes R.B., Chanock S.J., Jones R.C., Ramakrishnan R. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping using nanofluidic Dynamic Arrays. *BMC Genomics*, 2009, vol. 10, pp. 1471-1484. doi: 10.1186/1471-2164-10-561.

8. Slyadnev M.N. Microchip-based systems for molecular genetics analysis. *Russian journal of general chemistry*, 2012, vol. 82, no.12, pp. 118-13. doi: 10.1134/S1070363212120353.
9. Millis K.B., Ferre F., Gibbs R.A. The polymerase Chain Reaction. *Boston: Birkhauser*, 1994. 458 p. doi: 10.1002/hep.1840210344.
10. Unger M., Manger I.D., Lucero M., Yi Y., Miyashita-Lin E., Weinecke A., Facer G. *Microfluidic device and methods of using same*. Parent USA, no. 7,118,910 B2, 2006.
11. Shajhaev G. O. *Sukhaia smes' reagentov dlia polimeraznoi tsepnoi reaktsii i sposob provedeniia pstr-analiza* [Dry mixture of reagents for PCR and the way of PCR-analysis caring out]. Patent RF no. 2 259 401 C1, 2004 (in Russian).
12. Navolotskii D.V., Perchik A.V., Markyanov I.A., Ganeev A.A., Slyadnev M.N. [Microchip analytical system for multiplex analysis by real time polymerase chain reaction method with immobilized reagents into microreactors]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya* [Applied biochemistry and microbiology], 2011, vol. 47, no. 2, pp. 1-8 (in Russian).
13. Navolotskii D.V. Krisko A.V., Arnautov V.A., Gejbo D.S., Ganeev A.A., Slyadnev M.N. [Multiplex analytical system for DNA determination by real time PCR method]. *Nauchnoe priborostroenie* [Scientific instrumentation], 2010, vol. 20, no. 1, pp. 10-20 (in Russian).
14. Ravi N., Bukhovets V.L., Varshavskaya I.G., Sundararajan G. Deposition of diamond-like carbon films on aluminium substrates by RF-PECVD technique: Influence of process parameters. *Diamond & Related Materials*, 2007, vol. 16, pp. 90–97. doi: 10.1016/j.diamond.2006.04.001.
15. Gil E., Park J.B., Oh J.S., Yeom G.Y. Characteristics of SiOx thin films deposited by atmospheric pressure chemical vapor deposition as a function of HMDS/O2 flow rate. *Thin Solid Films*, 2010, vol. 518, pp. 6403-6407. doi: 10.1007/s11666-011-9642-0.
16. Zanini S., Riccardi C., Orlandi M., Grimoldi E. Characterisation of SiOxCyHz thin films deposited by low-temperature PECVD. *Vacuum*, 2008, vol. 82, pp. 290-293. doi: 10.1016/j.vacuum.2007.07.001.
17. Rey L., May J.C. *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. New York: *Taylor and Francis*, 2004. 600 p. doi: 10.1201/9780203021323.
18. Suvorova O., Perchik A., Slyadnev M., Navolotskii D., Mushnikov N. Rapid determination of sexually transmitted infections by real-time polymerase chain reaction using microchip analyzer. *Engineering*, 2012, vol. 4, pp. 1-3. doi: 10.4236/eng.2012.410B001.